Directrices de Laboratorio para la Detección y Diagnóstico de la Infección con el Nuevo Coronavirus 2019 (2019-nCoV)

01 de febrero de 2020

Los coronavirus son un grupo de virus ARN altamente diversos de la familia Coronaviridae que se dividen en 4 géneros: alfa, beta, gamma y delta, y que causan enfermedades de leves a graves en humanos y animales (1) (2) (3). Existen coronavirus humanos endémicos como los alfacoronavirus 229E y NL63 y los betacoronavirus OC43 y HKU1 que pueden causar enfermedades de tipo influenza o neumonía en humanos (1) (3). Sin embargo, dos coronavirus zoonóticos que causan enfermedades graves en humanos han emergido: el coronavirus del Síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV) en 2002-2003 y el coronavirus del Síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) (4) (5).

En enero de 2020, el agente etiológico responsable de un grupo de casos de neumonía grave en Wuhan, China, fue identificado como un nuevo betacoronavirus (2019-nCoV), distinto del SARS-CoV y MERS-CoV (6) (7). La secuencia genómica completa de este nuevo agente está disponible y se han desarrollado diferentes protocolos de detección, aunque aún no se han validado por completo. Sin embargo, a la luz de la posible introducción de un caso sospechoso relacionado con el 2019-nCoV en la Región de las Américas, la Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud (OPS / OMS) recomienda a los Estados Miembros garantizar su identificación oportuna, el envío de las muestras a laboratorios Nacionales y de referencia y la implementación del protocolo de detección molecular para 2019-nCoV, según la capacidad del laboratorio.

La OMS publicó el 17 de enero de 2020 una actualización de la guía provisional para pruebas de laboratorio para el nuevo coronavirus 2019 (2019-nCoV) en casos humanos sospechosos disponible (en inglés) en: https://www.who.int/health-topics/coronavirus/laboratory-diagnostics-for-novel-coronavirus.

Toma de muestras y envío adecuado

Las muestras deben ser tomadas por personal capacitado y teniendo en cuenta todas las instrucciones de bioseguridad, incluido el uso de los equipos de protección personal adecuado para virus respiratorios.

Las muestras recomendadas son las del tracto respiratorio inferior, incluidos el esputo, el lavado broncoalveolar y el aspirado traqueal (cuando sea posible según los criterios médicos). Sin embargo, cuando la toma de una muestra del tracto respiratorio inferior no es posible, las muestras del tracto respiratorio superior también son útiles. En general, se recomienda la toma de hisopados nasofaríngeo y orofaríngeo combinados (los hisopos deben colocarse y transportarse en un mismo tubo con medio de transporte viral). Aunque no se recomienda el muestreo de contactos asintomáticos de forma rutinaria, si se considera necesario de acuerdo con las guías nacionales, se deben considerar la toma muestras de las vías respiratorias superiores para este tipo de muestreo.

Las muestras deben mantenerse refrigeradas (4-8 °C) y enviarse al laboratorio (central, nacional o de referencia) donde se procesarán dentro de las 24-72 horas de la toma. Si no se pueden enviar muestras dentro de este período, se recomienda congelarlas a -70 °C (o menos) hasta que se envíen (asegurando que se mantenga la cadena de frío). El envío de muestras sospechosas a laboratorios de referencia o centros colaboradores fuera del país y por vía aérea debe cumplir con todas las normas internacionales (IATA) para Sustancias Biológicas de Categoría B.

Pruebas de laboratorio

La OMS ha puesto a disposición dos protocolos de diagnóstico molecular en la página web "Pruebas de laboratorio para casos humanos sospechosos del nuevo coronavirus 2019 (2019-nCoV)". La OMS no prefiere ni respalda los nombres de los vendedores ni los fabricantes incluidos en los protocolos. Además, estos protocolos aún no han sido validados a través del proceso de la OMS.

Además, los Centros para el Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) también han desarrollado un protocolo para detección molecular del nCoV. Este protocolo está disponible en el siguiente enlace:
https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-for-detection-instructions.pdf

Actualmente, OPS está trabajando para implementar el primer protocolo disponible en OMS, desarrollado por el Hospital Charité, Berlín Alemania. Este protocolo ha sido publicado y se puede encontrar en el siguiente enlace:
https://www.eurosurveillance.org/docserver/fulltext/eurosurveillance/25/3/eurosurv-25-3-5.pdf?expires=1580420806&id=id&accname=guest&checksum=D2E250BE3914A24D9381FC9538EFF11D

Este protocolo se basa en la detección de 3 marcadores diferentes: genes N, E y RdRp. Los ensayos para los genes E y N se entienden como protocolos de tamizaje para detectar cualquier beta-coronavirus asociado a murciélagos (no detectan coronavirus humanos comunes); el ensayo para RdRp es específico para coronavirus SARS y tipo SARS (incluyendo el 2019-nCoV).

Con esto, para el flujo de trabajo de rutina, se sugiere correr primero el ensayo para el gen N **o** el gen E (no es necesario correr los dos) como herramienta de tamizaje, seguido del ensayo de confirmación con el gen RdRp (Corman, et al., 2020).

Algoritmo de laboratorio

Los laboratorios deben continuar utilizando el algoritmo de laboratorio de influenza recomendado por la OPS para la vigilancia rutinaria de la influenza y de los casos inusuales de IRAG.

Las pruebas para el nCoV deben considerarse **sólo para pacientes que cumplan la definición del caso, una vez descartada la influenza y la influenza aviar**. Las definiciones de casos provisionales para la vigilancia epidemiológica y sus actualizaciones están disponibles en: https://www.who.int/internal-publications-detail/surveillance-case-definitions-for-human-infection-withnovel-coronavirus-(ncov)

Fortalecimiento de la capacidad de laboratorio y flujo de muestras

Con el fin de fortalecer la capacidad de respuesta de laboratorio para nCoV en las Américas y considerando la heterogeneidad de los Centros Nacionales de Influenza y los Laboratorios Nacionales de Influenza en la Región, la OPS ha propuesto 3 escenarios posibles de respuesta:

1- Laboratorios sin capacidad de diagnóstico molecular

Los laboratorios sin capacidad de diagnóstico molecular para implementar el protocolo molecular de nCoV deben enviar muestras clínicas sospechosas (ajustándose estrictamente a la definición de caso) a un laboratorio de referencia.

Se debe consultar a la oficina regional de la OPS antes de remitir muestras clínicas sospechosas de nCoV a un laboratorio de referencia.

2- Laboratorios con capacidad de diagnóstico molecular

2a. Laboratorios con capacidad de diagnóstico molecular para implementar la detección molecular del nCoV

Los laboratorios con capacidad de diagnóstico molecular pueden considerar implementar uno de los dos protocolos de detección molecular de nCoV mencionados anteriormente.

Las secuencias de iniciadores y sondas para la síntesis de oligonucleótidos y los protocolos de trabajo están disponibles para cada protocolo citado*.

**** Para apoyar a los laboratorios de la Región de las Américas, la OPS proporcionará controles positivos (disponibles próximamente) útiles (hasta ahora) solo para el protocolo de detección de diagnóstico del coronavirus de Wuhan 2019 por RT-PCR en tiempo real - Charité, Berlín, Alemania.***

Las muestras positivas por detección molecular deben notificarse de inmediato a través de los canales oficiales del RSI. Se debe consultar a la OPS para remitir muestras positivas de nCoV a un laboratorio de referencia.

2b. Laboratorios con capacidad de diagnóstico molecular y de secuenciación nucleotídica

Los laboratorios con capacidad de diagnóstico molecular pueden considerar la implementación de uno de los dos protocolos de detección molecular de nCoV puestos a disposición por la OMS mencionados anteriormente.

Las secuencias de iniciadores y sondas para la síntesis de oligonucleótidos y los protocolos de trabajo están disponibles para cada protocolo citado*.

Además, los protocolos de secuenciación pueden usarse para la identificación específica de nCoV en laboratorios con capacidad de secuenciación (Sanger o *Next Generation*) **solo en muestras positivas por PCR**.

Es importante recalcar que las muestras positivas por detección molecular deben notificarse de inmediato a través de los canales oficiales del RSI.

Se alienta a los laboratorios con capacidad de secuenciación a secuenciar oportunamente las muestras positivas y a compartir la información genética a través de GISAID (*Global Initiative on Sharing All Influenza Data Platform*) y GenBank.

Se debe consultar a la OPS para remitir muestras positivas de nCoV a un laboratorio de referencia.

2c. **Laboratorios con capacidad de diagnóstico molecular, pero sin detección molecular de nCoV implementada**

Los laboratorios con capacidad de diagnóstico molecular, pero sin capacidad para sintetizar los oligonucleótidos requeridos o para implementar el diagnóstico molecular de nCoV, deben seguir la guía para los laboratorios sin capacidad de diagnóstico molecular (acápite 1).

Envío de muestras al laboratorio de referencia en el CDC

Es importante tener en cuenta que el laboratorio de referencia para 2019-nCoV en el CDC **no** es el Centro Colaborador de OMS para Influenza. El laboratorio de Referencia en el CDC para muestras altamente sospechosas será el Laboratorio de Virus Respiratorios (diferentes a Influenza).

Los resultados obtenidos en el Centro Nacional de Influenza o Laboratorio Nacional de Salud Pública, deberán ser informados oportunamente según los canales establecidos y para la toma de las acciones necesarias. Como mecanismo de referencia, el laboratorio tendrá la **opción** de enviar las primeras muestras negativas (hasta 5 muestras) y las primeras muestras positivas (hasta 10 muestras) al laboratorio del CDC.

Para información adicional y logística sobre el envío de muestras sospechosas, por favor contacte a la oficina de OPS.

Referencias

1. **Hui, DSC and Zumla, A.** Severe Acute Respiratory Syndrome - Historical, Epidemiologic; and Clinical Features. [book auth.] HW Boucher, A Zumla and DSC Hui. *Emerging and Re-emerging Infectious Diseases - Clinics Revew Articles* . Philadelphia : Elsevier, 2019, pp. 869-889.

2. **Drosten , C, et al.** Severe acute respiratory syndrome: identification of the etiological agent. *Trends Mol Med.* 2003, Vol. 9, pp. 325-7.

3. **EI, Azhar, et al.** The Middle East Respiratory Syndrome (MERS). [book auth.] Boucher HW, Zumla A and DSC Hui. *Emerging and Re-emerging Infectious Dseases - Clinics Rebiew Articles.* Philadelphia : Elsevier, 2019, pp. 891-905.

4. **de Wit, E, et al.** SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology.* 2016, Vol. 14, pp. 523-524.

5. **R, Hilgenfeld and M, Peiris.** From SARS to MERS: 10 years of research on highly pathogenic human coronaviruses. *Antiviral Res.* 2013, Vol. 100, pp. 286-95.

6. **World Health Organization.** Laboratory testing of human suspected cases of novel coronavirus (nCoV) infection - Interim guidance. *WHO/2019-nCoV/laboratory/2020.1.* [Online] January 17, 2020. https://www.who.int/health-topics/coronavirus/laboratory-diagnostics-for-novel-coronavirus.

7. **GISAID.** Newly discovered betacoronavirus, Wuhan 2019-2020. *GISAID EpiFlu - Global Initiative on Sharing All Influenza Data.* [Online] January 2020. https://platform.gisaid.org/epi3/frontend#414223.